

【要約】

修士課程優秀論文

H4IIEC 肝細胞における転写因子 SREBP-1c に関連した
パルミチン酸およびエイコサペンタエン酸による
セレノプロテイン P 遺伝子発現制御Regulatory mechanism for gene expression of selenoprotein P by palmitate and
eicosapentaenoic acid associated with SREBP-1c in H4IIEC hepatocytes金沢大学大学院医薬保健学総合研究科恒常性制御学
(内科学第一)

田 島 奈 津 美

はじめに

食の欧米化に伴う生活習慣病の増加は、社会的・医療経済的に大きな問題となっており、栄養に関連した疾患の分子病態解明は喫緊の課題である。当研究室ではヒト肝臓で発現する遺伝子の包括的な解析から、セレノプロテイン P (SeP) が2型糖尿病におけるインスリン抵抗性を形成する鍵分子であることを同定した¹⁾。

このSePは主に肝臓で産生され、血中に豊富に存在する分泌タンパクである。また、セレノシステイン残基に富んでおり、必須微量元素セレンを輸送するタンパクとしての働きを担っている。SePがインスリン抵抗性を引き起こす分子メカニズムは完全に解明されておらず、この解明は2型糖尿病の新たな治療法開発に繋がる可能性がある²⁾。

インスリン抵抗性状態では遊離脂肪酸の血中濃度が上昇する。なかでも飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) は、血中遊離脂肪酸の30%以上を占め、過剰になるとインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されている³⁾。一方、 ω -3系多価不飽和脂肪酸は血中脂質改善作用、抗炎症作用など多彩な作用を持つことが知られており、なかでも高トリグリセリド血症治療薬として臨床で広く使用されているエイコサペンタエン酸 (EPA) は骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性を改善することや、非アルコール性脂肪性肝疾患を改善することが報告されている⁴⁾。しかしながら、PAおよびEPAがインスリン感受性に対して相反する作用を発揮する分子メカニズムは今までに完全には理解されていなかった (図1)。

そこで本研究では、PAおよびEPAが培養肝細胞におけるSeP遺伝子発現制御に及ぼす影響について検討を行った。

結 果

PA は SeP 発現を誘導し、EPA は SeP 発現を抑制する

PA および EPA が SeP 遺伝子 (遺伝子コード名 *SEPP1*) 発現に及ぼす影響を検討する行うために、ラット肝癌由来 H4IIEC3 肝細胞を用いて PA および EPA を処置した後、Real-time PCR にて遺伝子発現を、ルシフェラーゼ

アッセイにて転写活性を調べた。これらの結果から、PA は肝細胞の *SEPP1* 転写活性および *Sepp1* 遺伝子発現を誘導した。一方で、EPA は肝細胞の *SEPP1* 転写活性および *Sepp1* 遺伝子発現を抑制した。

SEPP1 プロモーターにおける PA および EPA 応答配列の探索

PA および EPA の *SEPP1* 転写活性に対する詳細な機序を調べるために、長さの異なった *SEPP1* プロモーターベクターを作製した。これらを用いて検討した結果、PA および EPA が *SEPP1* 転写活性を制御する領域を転写開始点から -200 ~ -100 bp に絞り込んだ。

その領域の中で結合しうる転写因子の配列を探索した結果、2型糖尿病と脂肪酸合成の関連が知られている転写因子 Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) の結合配列 Sterol regulatory element (SRE) に類似した配列 (SRE-like element) を -194 ~ -185 bp に有することを見出した。

SREBP-1c は SeP を正に制御する

まず、SREBP-1c は SeP 遺伝子発現を制御するのか検討した。核内活性型 SREBP-1c の過剰発現により、SREBP-1c の既知の標的遺伝子である Fatty acid synthase (遺伝子コード名 *Fasn*) と同様に、*Sepp1* 遺伝子発現および *SEPP1* 転写活性は亢進した。

一方、si-RNA を用いた *Srebp-1* 遺伝子の抑制により、*Fasn* と同様に *Sepp1* 遺伝子発現は減少した。この結果は、SREBP-1c が *Sepp1* 遺伝子発現を正に制御していることを示す。

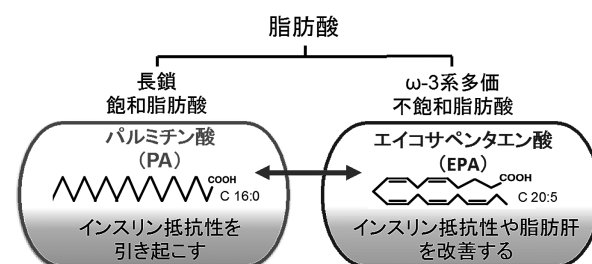


図1. 構造の違いから異なった作用を有する脂肪酸

PAはSREBP-1c非依存的にSeP発現を誘導する
EPAはSREBP-1cの核移行を抑制し、SREBP-1c不活化を介してSeP発現を抑制する

PAおよびEPAの*Sepp1*遺伝子発現制御にSREBP-1c経路を介するかどうかについて明らかにするために、PAおよびEPA処置時の*Srebp-1*と*Fasn*の発現量を評価した。予想に反して、PAによりSREBP-1とFASの遺伝子量およびタンパク量が減少した。この結果は、PAのSeP発現誘導効果はSREBP-1c経路非依存的であることを示唆する。

一方でEPAにより*Sepp1*, *Srebp-1*, *Fasn*遺伝子発現は同程度に減少した。また、EPAにより前駆体、核内活性型SREBP-1タンパク発現量は減少した。この結果は、EPAのSeP発現抑制効果はSREBP-1c経路依存的であることを示唆する。

SREBP-1cは粗面小胞体に結合する膜タンパクとして存在し、活性化されるとアミノ基側が切り出され、核内に移行することで転写活性を発揮する。そこで、EPAのSeP発現抑制効果においても、SREBP-1cの核移行が関与するか検討した。EPAは処置後1時間という短時間で前駆体SREBP-1を増加させ、核内活性型SREBP-1タンパク量を減少させた。この結果はEPAがSREBP-1cの核移行を抑制することを示す。

さらに、*SEPP1*プロモーター上のSRE-like elementを欠損させると、EPAによる*SEPP1*転写活性の低下作用が消失した。またChIP assayでは、EPAによりSREBP-1cの*Sepp1*プロモーターへの結合が減弱した。これらの結果は、EPAがSREBP-1cの*SEPP1*プロモーター-194~-185 bpへの結合を減弱させることにより、SeP発現を抑制することを示す。

考 察

本研究では、H4IIEC肝細胞において飽和脂肪酸であるPAはインスリン抵抗性誘導因子SePを誘導すること、さらに*SEPP1*プロモーターの-200~-100 bpにその応答領域があることを見出した。脂質合成系の代表的な転写因子であるSREBP-1cが結合しうるSRE-like elementがPA応答領域に存在することから、当初はPAによるSeP発現誘導にSREBP-1cが関与すると推測した。しかし予想に反して、PAにより肝細胞内のSREBP-1cの遺伝子発現および核内タンパク量は減少した。この結果はPAのSeP発現誘導がSREBP-1cを介していないことを示唆する。今後、PAの下流でSePを誘導する転写因子群を同定する必要がある。

EPAはPAとは対照的にSeP発現を抑制した。今回の研究は、EPAがSREBP-1cの核移行を抑制することによりSREBP-1cの遺伝子発現量および核内タンパク量が減少すること、プロモーター上SRE-like elementが欠損するとEPAによる*SEPP1*転写活性抑制効果が消失すること、ならびにEPAによりSREBP-1cの*SEPP1*プロモーターへの結合が減弱することを示しており、EPAがSREBP-1cの不活化を介してSeP遺伝子発現を抑制することを初めて明らかにした。

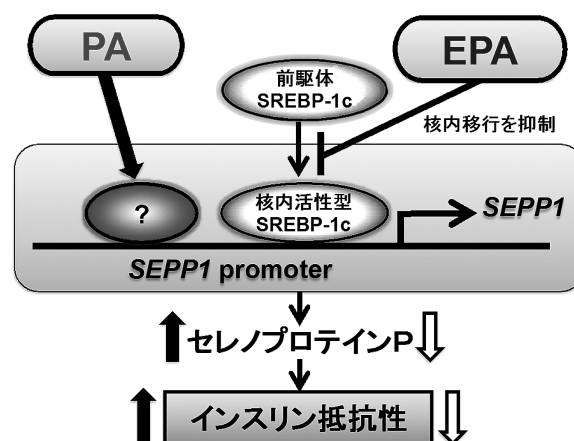


図2. PA および EPA による SeP 発現制御メカニズム

EPAは栄養シグナルセンサーであるAMPK (AMP-activated protein kinase) を活性化するため⁵⁾、EPAによって活性化されたAMPKがSREBP-1cをリン酸化し、SREBP-1cを不活化することでSePの発現を抑制する可能性を考える。

結 語

H4IIEC肝細胞において、*Sepp1*遺伝子発現はPAにより誘導される一方でEPAにより抑制されること、転写因子SREBP-1cがSeP発現を上方制御していること、ならびにEPAによるSeP発現抑制はSREBP-1c不活化を介することが明らかとなった(図2)。今後、マウスおよび臨床サンプルを利用したさらなる研究により、EPAの全身のインスリン抵抗性改善薬としての新たな臨床的有用性を明らかにしたい。

参 考 文 献

- 1) Misu H, et al. Cell Metab. 12: 483-495, 2010
- 2) Takayama H, et al. J Biol Chem. 289: 335-45, 2014
- 3) Nakamura S, et al. J Biol Chem. 284: 14809-14818, 2009
- 4) Ishii H, et al. J Hepatol. 50:562-71, 2009
- 5) Suchankova G, et al. Biochem Biophys Res Commun. 26: 851-858, 2005



Profile

2004年 九州女子大学家政学部
家政学科管理栄養士専攻卒業
2004～2009年 金沢大学附属病院勤務
2009～2011年 東京大学医学部附属病院勤務
2011年3月 金沢大学大学院医薬保健学
総合研究科修士課程 修了
2011年3月 金沢大学大学院医薬保健学
総合研究科博士課程 在籍中